COMPASS® *Listeria* Agar

DOMAINE D'UTILISATION

COMPASS® *Listeria* Agar est un milieu sélectif utilisé pour les différenciation, isolement et dénombrement de *Listeria monocytogenes* dans les produits alimentaires, les échantillons de l'environnement et les prélèvements pathologiques d'origine animale, même fortement contaminés. Sa formulation correspond à celles préconisées dans les protocoles de recherche et de dénombrement des normes internationales EN ISO 11290-1 et 11290-2 incluant l'amendement A1.
COMPASS® *Listeria* Agar est également employé dans le cadre d'une méthode alternative rapide de recherche de *L. monocytogenes*, dans les produits d'alimentation humaine et échantillons de l'environnement, raccourcie à une seule étape préalable d'enrichissement sélectif : elle est officiellement certifiée par AFNOR Certification, sous Attestation N° BKR 23/2-11/02, dont le terme de validité est fixé au 28 novembre 2010.
COMPASS® *Listeria* Agar peut aussi être employé dans le cadre d'une méthode alternative rapide de dénombrement de *L. monocytogenes* dans les produits d'alimentation humaine et échantillons de l'environnement, par ensemencement d'une seule boîte en surface ou en profondeur : elle est officiellement certifiée par AFNOR Certification, sous Attestation N° BKR 23/05-12/07, dont le terme de validité est fixé au 4 décembre 2011.

HISTORIQUE

En 1991, MENGAUD *et al*. ont identifié une phospholipase C phosphatidyl-inositol spécifique (PI-PLC) produite par les deux espèces de *Listeria* pathogènes, *L. ivanovii* et *L. monocytogenes*, seule cette dernière l'étant pour l'Homme. Ils ont suggéré que cette enzyme pouvait constituer un facteur de virulence. La même année, NOTERMANS *et al.* développèrent une méthode en double couche pour détecter la PI-PLC en milieu gélosé à l'aide de L-α-phosphatidylinositol. Dans ces conditions, les deux espèces de *Listeria* pathogènes forment des colonies entourées d'un halo opaque, alors que les colonies des espèces non pathogènes n'en présentent pas. Par ailleurs, l'utilisation d'un substrat chromogène, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside, permet de remplacer l'esculine qui était utilisée dans les milieux Oxford et PALCAM. La présence d'esculinase (β-glucosidase) peut ainsi être mise en évidence par la formation d'un précipité bleu sur la colonie. Le mélange sélectif contenu dans le milieu, permet l'inhibition de la presque totalité des bactéries contaminantes.

En associant ces trois principes, **COMPASS® *Listeria* Agar** permet la mise en évidence de colonies bleues entourées d'un halo opaque, bien typiques de *Listeria monocytogenes*.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

PRINCIPES

- Les peptones et les facteurs de croissance (extrait de levure, pyruvate de sodium et sulfate de magnésium) favorisent la croissance de *Listeria monocytogenes.*
- L'extrait de levure est une source du complexe vitaminique B.
- Le chlorure de sodium maintient l'équilibre osmotique du milieu.
- Les *Listeria* hydrolysent le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside (ou X-β-glucoside). Le produit résultant subit une dimérisation oxydative qui se traduit par la formation d'un précipité bleu sur les colonies.
- Le phosphatidyl-inositol est utilisé comme substrat pour la détection de la phospholipase C de *Listeria monocytogenes*. Lorsqu'il est dégradé, un précipité opaque apparaît autour des colonies.
- Le chlorure de lithium et le mélange sélectif constitué de plusieurs antibiotiques et d'un antifongique assurent l'inhibition de la microflore secondaire.

PREPARATION DU MILIEU COMPLET A PARTIR DU DESHYDRATE (BK192) ET DE SES SUPPLEMENTS (BS070 + BS071)

- Mettre en suspension 71,9 g de milieu de base déshydraté (BK192) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en flacons de 1 L.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes
- Refroidir et maintenir à 44-47°C.
- Reprendre le lyophilisat du supplément sélectif (BS071) en y ajoutant aseptiquement 10 mL d'eau distillée stérile.
- Dans le flacon de 1 L de milieu de base, ajouter stérilement d'abord les 10 mL de supplément sélectif et ensuite les 30 mL de supplément d'enrichissement (BS070).
- Homogénéiser parfaitement après l'introduction de chaque supplément.
- Couler en boîtes de Petri stériles, ceci dans le cadre de l'utilisation de **COMPASS® *Listeria* Agar** dans un protocole de recherche ou de dénombrement par ensemencement en surface.
- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.

PREPARATION DU MILIEU COMPLET A PARTIR DU KIT BT008

- Faire fondre le milieu de base (réactif R1 (BM12800) du kit BT008) pendant le minimum de temps nécessaire à sa reliquéfaction totale.
- Refroidir et maintenir à 44-47°C.
- Reprendre le lyophilisat du supplément sélectif (réactif R2 (BS06700) du kit BT008) en y ajoutant aseptiquement 2 mL d'eau distillée stérile.
- Dans chaque flacon de 200 mL de milieu de base, ajouter stérilement d'abord 2 mL de supplément sélectif et ensuite 6 mL de supplément d'enrichissement (réactif R3 (BS06800) du kit BT008).
- Homogénéiser parfaitement après l'introduction de chaque supplément.
- Couler en boîtes de Petri stériles, ceci dans le cadre de l'utilisation de **COMPASS® *Listeria* Agar** dans un protocole de recherche ou de dénombrement par ensemencement en surface.
- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

MODE D'EMPLOI (méthode alternative rapide de recherche)

- Préparer une suspension mère de l'échantillon à analyser dans un bouillon de **Fraser-demi** [BK133 + (BS030 ou BS032) ou BK173 + (BS059 ou BS062) ou BM016 par exemple] en respectant un rapport prise d'essai/milieu d'enrichissement de 1/10ème.
- Incuber la suspension mère à **(30 ± 1)°C pendant (24 ± 2) heures**.
- Déposer 100 µL de la culture obtenue sur une boîte de **COMPASS® *Listeria* Agar** préparée ou pré-coulée (BM123 ou BM124) et réaliser un isolement à l'aide d'une anse bouclée ou d'une pipette Pasteur.
- Incuber à **(37 ± 1)°C pendant (24 ± 2) heures**. Il est possible de prolonger l'incubation jusqu'à 48 heures.

NOTA 1 :

Lors de l'étude de validation, pour deux échantillons de produits laitiers, les halos sont apparus à 48 heures d'incubation

MODE D'EMPLOI (méthode alternative rapide de dénombrement)

- Préparer une suspension mère de l'échantillon à analyser dans de l'**eau peptonée tamponnée** [BK018, BK131 ou BM010, BM056, BM057 par exemple].
- Incuber la suspension à **(20 ± 2)°C pendant (60 ± 5) minutes**.
- Transférer 0,1 mL de la suspension et, si nécessaire, de ses dilutions décimales successives à la surface d'une seule boîte (par dilution) de **COMPASS® *Listeria* Agar** préparée ou pré-coulée (BM123 ou BM124).
- Etaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.
- ou
- Transférer 1 mL de la suspension et, si nécessaire, de ses dilutions décimales successives dans une seule boîte de Petri stérile (par dilution).
- Couler environ 15 mL de milieu complet.
- Homogénéiser parfaitement et laisser solidifier sur une surface froide.
- Incuber à **(37 ± 1)°C pendant (24 ± 2) heures**.
- **En l'absence de colonies caractéristiques** (c'est à dire absence de colonies ou colonies bleues avec halos encore peu visibles à 24 heures), **prolonger l'incubation de 24 heures supplémentaires.**
- L'expression des résultats se fera conformément aux recommandations établies dans la norme ISO 7218 (août 2007).

NOTA 2 :

COMPASS® *Listeria* Agar s'inscrit également comme premier milieu d'isolement obligatoire du protocole opératoire de recherche de *L. monocytogenes* tel que décrit dans le texte normatif EN ISO 11290-1/A1, ainsi que comme milieu unique du protocole opératoire de dénombrement de *L. monocytogenes* selon l'EN ISO 11290-2/A1.

NOTA 3 :

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, les prises d'essai supérieures à 25 g n'ont pas été testées.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

LECTURE

Les colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* apparaissent bleues à bleu vert et sont entourées d'un halo opaque. Les autres espèces de *Listeria* forment des colonies bleues à bleu vert, sans halo. Il est à noter que des souches de *Listeria ivanovii* peuvent présenter des colonies caractéristiques, de tailles néanmoins plus réduites.

CONFIRMATION

Dans le cadre de la marque AFNOR VALIDATION, tous les résultats positifs doivent être confirmés de la (l'une des) manière(s) suivante(s) :

Option 1 : Mise en œuvre des **tests classiques décrits dans les méthodes normalisées par le CEN ou l'ISO (en incluant l'étape de purification),** en repartant des colonies caractéristiques isolées sur **COMPASS® *Listeria* Agar**.
Pour les modalités de confirmation se reporter à la norme NF EN ISO 7218.

Option 2 : Mise en œuvre de **CONFIRM' *L. mono* Agar** ®.

Option 3 : Utilisation de **toute autre méthode certifiée AFNOR VALIDATION**, de **principe différent**. Le protocole validé de la seconde méthode devra être respecté dans son ensemble, c'est à dire que toutes les étapes antérieures à l'étape intermédiaire de laquelle on repart pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.
Les deux méthodes validées (l'une utilisée en détection et l'autre en confirmation) doivent donc avoir un tronc commun.

En cas de résultats discordants (positifs par la méthode alternative, non confirmés par l'une des options décrites ci-dessus), **le laboratoire devra mettre en œuvre les moyens suffisants pour s'assurer de la validité du résultat rendu.**

NOTA 4 :

Lorsque la présence de *Listeria monocytogenes* a déjà été confirmée lors de la recherche, il est possible de s'affranchir de l'étape de confirmation à l'issue du dénombrement, en cas de résultat positif.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

FORMULE – TYPE du milieu complet

(pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande .....18,00 g
- Tryptone.....6,00 g
- Extrait de levure .....10,00 g
- Pyruvate de sodium .....2,00 g
- Glucose.....2,00 g
- Glycérophosphate de magnésium .....1,00 g
- Sulfate de magnésium anhydre .....0,50 g
- Chlorure de sodium.....5,00 g
- L-α-phosphatidyl-inositol.....2,00 g
- Hydrogénophosphate disodique anhydre .....2,50 g
- Chlorure de lithium.....10,00 g
- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside.....0,05 g
- Acide nalidixique .....0,02 g
- Ceftazidime .....0,02 g
- Polymyxine B (sulfate) .....76700 UI
- Cycloheximide.....0,05 g
- Agar agar bactériologique.....12,00 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2.

CONTRÔLE QUALITE

- Aspect, couleur milieu de base déshydraté : poudre beige, fluide et homogène.
- Aspect, couleur milieu préparé (complet) et prêt-à-l'emploi (complet): gélose ambrée, opalescente.
- Réponse culturale typique après 24-48 heures d'incubation à 37°C :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : P_R)	Caractéristiques
Listeria monocytogenes	CIP 59.53	$P_R \geq 50\%$	colonies bleu vert entourées d'un halo opaque
Listeria monocytogenes	CIP 78.31	$P_R \geq 50\%$	colonies bleu vert entourées d'un halo opaque
Listeria innocua	ATCC® 33090	Bonne, score 2	colonies bleu vert sans halo
Enterococcus faecalis	ATCC 29212	inhibée, score 0	
Escherichia coli	ATCC 25922	inhibée, score 0	

STOCKAGE / CONSERVATION

Milieu de base déshydraté :
- Stocker entre 2 et 30°C, à l'abri de la lumière.
- La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette

Milieu complet préparé en boîtes, avec suppléments : 15 jours à 2-8°C (à titre indicatif).

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri et Kit, Supplément d'enrichissement et supplément sélectif :
- Stocker entre 2 et 8°C, à l'abri de la lumière.
- La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

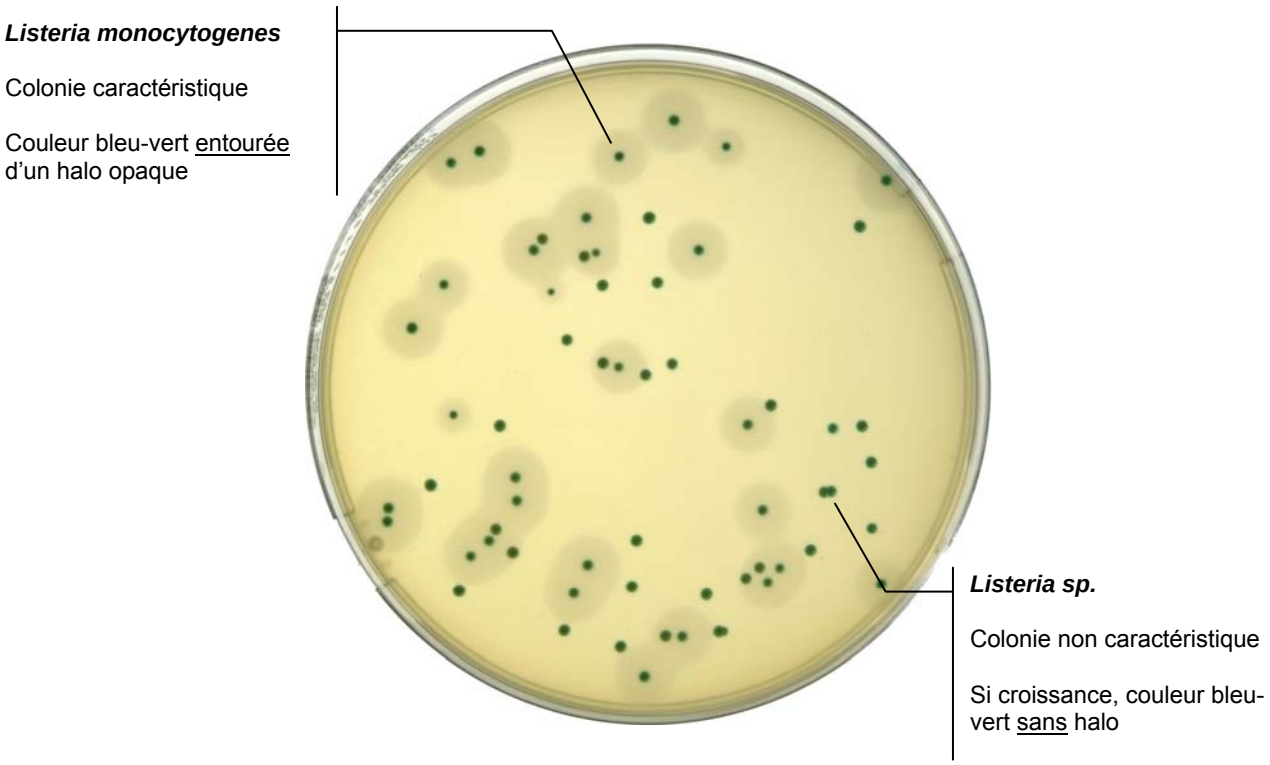
PRESENTATION	Code
Milieu de base déshydraté:	
- Flacon de 500 g	BK192HA
Supplément d'enrichissement :	
- Pack de 8 flacons pour 8 x 1 L de milieu de base	BS07008
Supplément sélectif :	
- Coffret de 8 flacons pour 8 x 1 L de milieu de base	BS07108
Milieu pré-coulé en boîtes de Petri (Ø 90 mm) :	
- Coffret de 20 boîtes	BM12308
- Coffret de 120 boîtes	BM12408
Kit :	
- Coffret composé de 6 flacons de 200 mL de milieu de base (R1), de 6 flacons qsp 200 mL de supplément sélectif lyophilisé (R2) et de 6 flacons qsp 200 mL de supplément d'enrichissement liquide (R3)	BT00808

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

SUPPORT PHOTO :

Référence : BK192HA + [BS07008 + BS07108], BM12308/12408, BT00808

Domaine d'utilisation : Recherche et dénombrement des *Listeria monocytogenes*.



COMPASS® *Listeria* Agar

Réf : BM12308

Incubation 24 heures à 37°C (surface)

Colonies caractéristiques bleu-vert entourées d'un halo opaque
(hydrolyse du X-β-glucoside et dégradation du L-α-phosphatidyl-inositol)

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

MENGAUD, J., BRAUN-BRETON, C., and COSSART, P.. 1991. Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor ? Molecular Microbiology, **5(2)** : 367-372.

NOTERMANS, S.H., DUFRENNE, J., LEIMESTER-WÄCHTER, M., DOMANN, E., and CHAKRABORTY, T.. 1991. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. Applied and Environmental Microbiology, **57(9)** : 2666-2670.

OTTAVIANI, F., OTTAVIANI, M., AGOSTI, M.. 1997. Esperienza su un agar selettivo e differenziale per Listeria monocytogenes. Industrie Alimentari, **36** : 1-3

OTTAVIANI, F., OTTAVIANI, M., and AGOSTI, M.. 1997. Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Froid Symposium Proceedings p6. ADRIA Quimper France. 16-18 June 1997.

NF EN ISO 16140 (V 08-103). Octobre 2003. Microbiologie des aliments. Protocole pour la validation des méthodes alternatives.

XP CEN ISO/TS 11133-2 (V 08-104-2). Janvier 2004. Microbiologie des aliments. Guide pour la préparation et la production des milieux de culture. Partie 2 : Guide général pour les essais de performance des milieux de culture.

NF EN ISO 11290-1/A1 (V 08-028-1/A1). Février 2005. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes.* Partie 1 : Méthode de recherche - Amendement 1 : Modification des milieux d'isolement, de la recherche de l'hémolyse et introduction de données de fidélité.

NF EN ISO 11290-2/A1 (V 08-028-2/A1). Février 2005. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes.* Partie 2 : Méthode de dénombrement - Amendement 1 : Modification du milieu d'isolement.

NF EN ISO 7218 (V 08-002). Octobre 2007. Microbiologie des Aliments. Exigences générales et recommandations.

NF V45-008. Mars 2009. Poissons transformés. Méthode pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes* aux faibles niveaux de contamination dans le saumon fumé et la truite fumée.

BKR 23/2-11/02 et BKR 23/05-12/07
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification
www.afnor-validation.org

COMPASS® et **CONFIRM' *L. mono* Agar®** sont des marques de SOLABIA S.A.S.

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document.
Les informations et les spécifications contenues dans cette fiche technique ont été établies à la date du 2009-06-08.
Elles sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.
Code document : BM123/F/2007-05 : 6

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B.P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – France
Tél : + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax : + 33 (0)3 44 14 33 34 – www.biokar-diagnostics.fr